

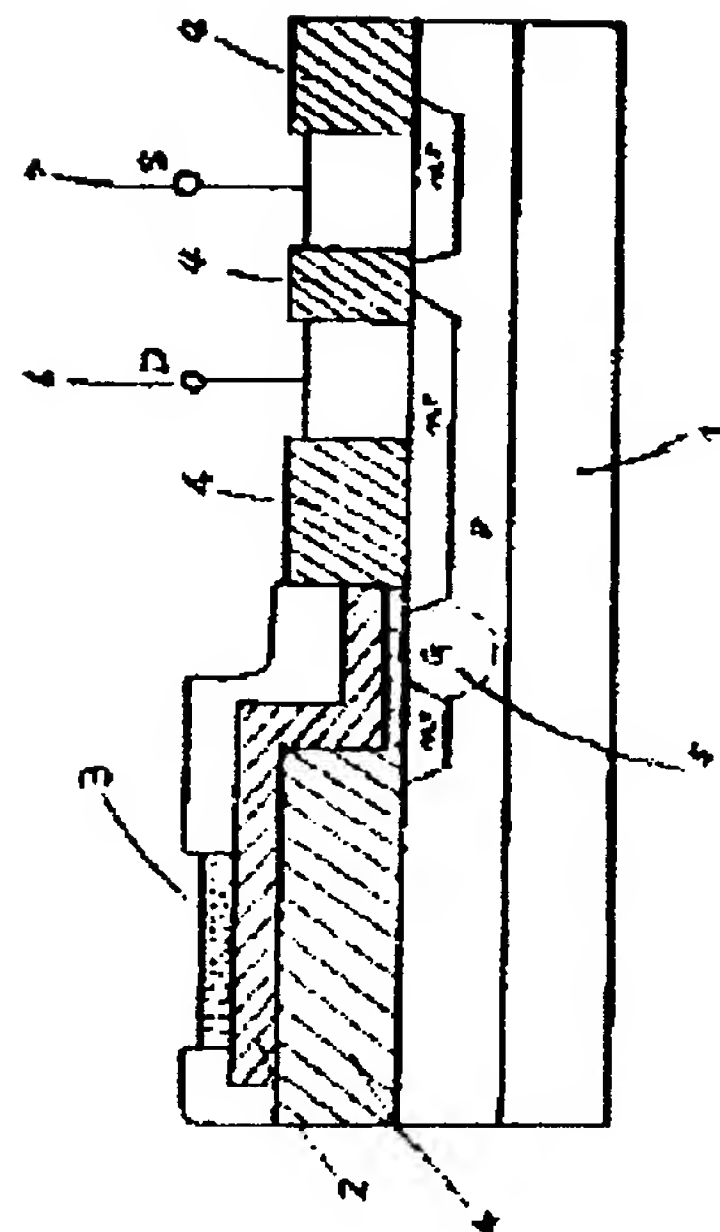
BIOSENSOR

Patent number: JP62185160
Publication date: 1987-08-13
Inventor: KATSUBE TERUAKI; ARAKI TATSUO; HARA MASASHI
Applicant: TERUMO CORP
Classification:
- international: G01N27/30
- european:
Application number: JP19860027277 19860210
Priority number(s): JP19860027277 19860210

Report a data error here

Abstract of JP62185160

PURPOSE: To obtain a biosensor excellent in stability, capable of measuring the concn. of a substrate with good selectivity, having sufficient strength and easy to handle, by directly fixing an enzyme film on the ion sensitive film of a separation gate type ISFET using a sapphire substrate. **CONSTITUTION:** A separation gate type ISFET is provided to a sapphire substrate and an ion responsive film 2 having an enzyme film 3 fixed thereto is provided to the sapphire substrate at a position slightly separated from said ISFET through an insulating material 4. ISFET has a drain 6, a source 7 and a gate 5 while the gate 5 is connected to the ion responsive film 2. The ion responsive film 2 is used by a method for providing iridium oxide or palladium oxide to the substrate by vapor deposition from the aspect of the excellent pH-sensitivity thereof. The enzyme film 3 contains enzyme and has function for supporting said enzyme on the responsive film 2 and, as enzyme, for example, urease (for detecting urea) and glucose oxidasse (for detecting glucose) etc. decomposing a substrate to generate a proton are used.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-185160

⑬ Int.Cl.⁴

G 01 N 27/30

識別記号

庁内整理番号

J-7363-2G
F-7363-2G

⑭ 公開 昭和62年(1987)8月13日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサー

⑯ 特 願 昭61-27277

⑰ 出 願 昭61(1986)2月10日

⑱ 発 明 者	勝 部	昭 明	多摩市永山3丁目1番1号
⑱ 発 明 者	荒 木	達 生	浦和市大字田島440番地
⑱ 発 明 者	原	正 史	浦和市別所4丁目2番43号
⑲ 出 願 人	テルモ株式会社		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

明 細 書

1. 発明の名称

バイオセンサー

2. 特許請求の範囲

1. サファイヤ基板を用いた分離ゲート型ISFETのイオン感応膜に酸化イリジウムまたは酸化パラジウムを用い、このイオン感応膜の上に直接酵素膜を固定させたバイオセンサー。

2. 前記酵素がウレアーゼである特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサー。

3. 前記酵素がグルコースオキシダーゼである特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサー。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は分離ゲート型ISFET(イオン・センシティブ・フィールド・エフェクト・トランジスター(Ion Sensitive Field Effect Transistor))を用いたバイオセンサー、^{特許}サファイヤ基板を用いた分離ゲート型ISFETのイオン感応膜の上

に直接酵素固定化膜を被覆させたバイオセンサーに関する。

なお、本発明において、「分離ゲート型ISFET」とは、基板、バリアー膜及びゲート部がソースに接続した構造において、イオン感応膜とゲート部が同一基板上に距離をおいて形成された構造のFETをいう。

〔従来の技術〕

近年、半導体技術及びこの技術を利用したIC技術の進歩と相俟って、ISFETを利用した水素イオン、ナトリウムイオンの濃度測定用センサーがビー・ベルクフェルト(P. Bergverd)、松尾、ケー・デー・ワイズ(K. D. Wise)によって報告されている(アイ・イー・イー・イー・トランスアクションズ(I. E. E. E. Trans.) BEM-19,342(1972); 同、BEM-21,485(1974))。

ISFETは、一般に基板、バリアー膜及びイオン感応膜から構成され、イオン感応膜はゲート部の上に形成されている。そして、このよう

特開昭62-185160 (2)

構成を有するため、ISFETを被検液に浸漬すると、イオン濃度に応じてイオン感応膜の表面電位が変化し、この電位変化を例えばソースとドレイン間の電流変化として測定し、標準溶液での結果を参照することによってイオン濃度を知ることができる。

しかしながら、MOS基板ベースのMOSFETをもとに作成される従来のバイオセンサーは、ゲート部の上に直接酵素固定化膜を被着した構造であるため、センサーを被検液中に浸漬するとゲート部分に液が浸み込んだり、ゲート部分が光に感受したりしてドリフトが発生しめい等の問題点があった。また、従来のバイオセンサーに使用されている前記ゲート基材では、その上に固定化酵素膜を被着するには、基材表面にシランカップリング剤処理を必要とするため、センサーの製作工程が複雑であるという欠点があった。

このような問題点を解決し、ISFETの応答の安定化を図る方法として、最近、分離ゲート

型ISFETの検討が進められている。分離ゲート型ISFETでは、イオン感応膜部のみを被検液に浸漬すればよく、FETゲート部はソース、ドレイン構成部分と同様に光や外界から遮断された構造であるため、応答の安定化が図れると考えられている。

ところが、イオン感応膜として従来のゲート基材の如く絶縁物を使用している限りにおいては、分離ゲート型構造とすることは困難であった。

斯かる状況において、本発明者は、先にイオン感応膜として電子伝導性の酸化イリジウム膜を使用すれば分離ゲート型ISFETの製作が可能で、酸化イリジウムはバリアー膜とのなじみが良好な点、そして酸化イリジウム膜はpH感度がよく優れたpHセンサーとして機能しうることを見出した〔勝部(T. Katsube): 1984 International Symposium on Industrial Electronics, Control and Instrumentation〕。

(International Conference on Industrial Electronics, Control and Instrumentation) オクトーバー (October) 22-26, 1984〕。

しかし、これまでのISFETは一般にシリコン基板を用いて製作されている。しかし、イオンセンサーに用いるとき、溶液中に浸されて使用されるため、シリコン基板を溶液から絶縁する必要がある。このためシリコン基板に穴をあけたのち酸化し、シリコン基板表面に酸化膜を形成する方法が用いられている。

しかし、この方法は製造工程が複雑になると共に形成された酸化膜がもろいため破壊されやすく、絶縁性が維持されにくいものであった。さらに、シリコン基板を用いたものは、十分な強度を有していないため、それを用いたバイオセンサーは、取扱が困難であるという欠点を有していた。

本発明者らは、通常のISFETタイプのバイオセンサーの有する上記欠点を克服すべく鋭意検討の結果、サファイア基板を用い、イオン感

応膜に酸化イリジウムまたは酸化パラジウム膜を用いた分離ゲート型ISFETのイオン感応膜は水溶液中で処理すれば容易に酵素の固定化が行なえること、そして酵素固定化膜を有する上記分離ゲート型ISFETが優れたセンサー特性を有することを見出し、本発明を完成した。

〔発明の目的〕

すなわち本発明は、サファイア基板を用いた分離ゲート型ISFETのイオン感応膜に酸化イリジウムまたは酸化パラジウムを用い、このイオン感応膜の上に直接酵素膜を固定させたバイオセンサーを提供するものである。

さらに、前記酵素は、ウレアーゼまたはグルコースオキシターゼが好ましい。

〔発明の具体的説明〕

本発明を図1図に示す実施例を用いて説明する。

本発明のバイオセンサーは、サファイア基板1上にFETとこのFETより少し離れた位置に酵素膜3を固定したイオン感応膜が絶縁材4の

特開昭62-185160 (3)

上に設けられており、さらにFET 5は、ドレイン⁴とソース⁷とゲート⁹を有しており、ゲートはイオン感応膜2と接続されている。

サファイア基板としては、膜厚0.30mm以上のものが好ましく使用される。膜厚が0.30mm未満ではバイオセンサーとして形成されたものの使用時の強度に耐えないおそれがあるからであり、また1.0mm以上では、チップ状に加工する時、切断が困難であり、材料費用も高くなるからである。このサファイア基板の上にのせるイオン感応部となるシリコン層(例p型シリコン)の膜厚は 0.53 ± 0.05 程度が好ましい。この場合、比抵抗 $20 \Omega \cdot \text{cm}$ 程度以下のものを用いる。

FET 5は、サファイア基板1上に常法により形成されるが、一般にサファイア基板上にn型またはp型シリコンをエピタキシャル成長させて設けたシリコン層を有するものを用いることが好ましい。この場合、n型シリコン層を有するものにあつては、ソース、ドレインとなる部分にp型シリコンをホトレジスト法、放電処理

FET 5のゲート⁹とイオン感応膜2とは導電性材料(酸化イリジウム、酸化パラジウム等)より接続されている。

そして、イオン感応膜2の上には、酵素膜3が固定されている。酵素膜3は、酵素を含有するとともにその酵素をイオン感応膜上に支持する働きを有する。

本発明に使用される酵素としては、基質を分解してプロトンを生産させるものならば使用でき、例えばウレアーゼ(尿素検出用)、グルコースオキシダーゼ(グルコース検出用)、ペニシリナーゼ(ペニシリン検出用)、トリプシン(ペプチド検出用)、リパーゼ(脂肪酸検出用、例えばホスホリパーゼ(アセチルコリン検出用))、ペプチダーゼ(スレオニン検出用)等が挙げられる。

また、酵素膜を酸化イリジウムまたは酸化パラジウムイオン感応膜上に被覆するには、通常の酵素固定化法が使用でき、例えば牛血清アルブミンを加えたトリス-塩酸緩衝液に酵素を溶

法、熱拡散法等公知の方法を用いて、またそれらを組合せてFETを形成させる。

FET 5の位置は、サファイア基板1上の端部付近に形成することが好ましい。また、イオン感応膜2は、FET 5のゲート⁹と離れた他端部付近に設けることが好ましい。そのようにすれば、サファイア基板1の全体を有効に利用でき、しかも絶縁技術上も有利になるからである。

そして、サファイア基板1の他端付近にイオン感応膜3が形成されている。SOS構造のものを用いた場合この上に絶縁材4をのせ、その上にイオン感応膜2を形成する。絶縁材4としては、 SiO_2 が好適に使用される。イオン感応膜2としては、酸化イリジウム、または酸化パラジウムが使用される。これらのものを使用するのは、pH感度が優れているからである。イオン感応膜2をサファイア基板1上に設ける方法としては、反応性スパッタ法等により、酸化イリジウムまたは酸化パラジウムをサファイア基板1上に蒸着する方法が好的に使用される。

かし、これをイオン感応膜上に塗布、乾燥させた後、グルタルアルデヒド溶液を滴下して架橋反応により固定化する方法が挙げられる。斯くして得られた固定化膜と酸化イリジウム膜との密着性は極めて良好である。膜厚は、特に制限はないが、通常 $400 \sim 1000 \text{ \AA}$ となるように被覆される。また、酵素の固定化膜の厚さとしては、 $50 \sim 100 \text{ nm}$ 程度に設定するのが好ましい。

そして、サファイア基板1上に、酵素膜3を有さない以外は、上記したバイオセンサーと同一の構成を有する比較電極¹⁰を設けることが好ましい。比較電極¹⁰は、FETのドリフト等を見るためのものである。比較電極¹⁰は、別な基板上に設けてもよいが、同一の基板上に設ける方が、測定においても1つのセンサーを被検液に浸すだけで済み、さらに、形成されるFETもかなり均質なものを形成することができ好ましい。そして、この比較電極¹⁰は、上述の通り基本構成は、上記したバイオセンサーに用いられる構成と同じであるが、酵素膜が設けられていない点

特開昭62-185160 (4)

が相違するのである。より好ましくは、熱または酸等で失活させた酵素の酵素膜を設けることである。この方がよりドリフト等の影響を把握できるからである。

次に、本発明のバイオセンサーに使用される測定回路を説明する。測定回路は、第2図に示す通りであり、これは、対照用電極の測定回路を含めたものである。測定回路は、検査対象溶液とイオン感応膜間の界面電位変化を直接測定するためのものである。また、検査対象溶液に対する応答特性は酵素を固定化したバイオセンサーと、対照用として酵素を固定化しないかまた失活させた酵素を固定したFETにて構成されている対照用電極との差動出力で測定した。

測定回路を簡単に説明する。

オペアンプからなる帰還回路によりバイオセンサー対照用電極には一定のドレイン電流が流れ、また、ソース・ドレイン間には常に一定の電圧が加えられている。溶液の電位はAg/AgCl電極により一定に保たれ、溶液のpH変化によ

て生ずる溶液とイオン感応膜界面の界面電位変化がA、B端子に現われる。この2つの出力を差動増幅器に入力し、その差の出力がレコーダに時間変化として記録される。

〔発明の効果〕

本発明のバイオセンサーは、上記の如く構成されるものであるため、分離ゲート型ISFETの安定性等の優れた特性を保持し、同時に酵素を用いたセンサーであるため、選択性よく基質の濃度を測定することができる。さらに、分離ゲート構造であるため、イオン感応膜の面積や形態、厚さ等に比較的自由度が大きく実用上有利に使用することができる。

また、サファイア基板は十分な強度を有しているため本発明のバイオセンサーも十分な強度を有しており、取扱が容易であり、さらに、1つのサファイア基板上に、酵素を固定しないかまた失活させた酵素を固定した対照用のFETを設けることができる。

次に実施例を挙げて説明する。

実施例 1

下記方法に従って、第1図に示す構造の分離ゲート型ISFETを用いたバイオセンサーを作製した。

(1) FETの作成

板厚350 μ mのサファイア基板の一方の面の上面に、シリコン層幅0.5mm、長さ6mm、厚さ0.60 μ m(エピタキシャル成長したもの)を設け、SOS(シリコンオンサファイア: Silicon on Sapphire)構造物を形成した。そして、上記シリコン層上に、ホトレジスト法、放電処理法を組み合わせて基板の一部にFETを形成させた。

(2) 分離ゲート型ISFETの作成

上記FETが形成されたSOS構造物を用い、FETのゲート部とは距離をおいた位置であって、シリコン層が形成されているサファイア面上でありかつ、FETのゲート部及びそれをこえるように絶縁材SiO₂を設け、その上にイオン感応膜となる酸化イリジウム感応膜を、

5 $\times 10^{-3}$ Torr真空下、純酸素中にて反応性スパッタ法を用いて形成させた。膜厚は800Åであった。その後上記FETのゲート部とイオン感応膜を短い導線により結合した。またFETのソース部とドレイン部にはそれぞれ電極を設けた。その後、電極を完全に被包しないようにFET、導線、イオン感応膜を絶縁体(テッパケイ素)にて絶縁した。さらに、絶縁物の一部を除去して150 \times 500 μ mのイオン感応膜露出面を設けた。この露出面に下記方法により酵素膜を成膜した。

(3) バイオセンサーの作製

0.2Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)-15%牛血清アルブミン溶液(半井化学薬品(株)製)にクレアゼ(東洋紡織(株)製)を溶解させた液5 μ lをマイクロシリンジで採取し、イオン感応膜露出面の上に塗布、風乾させた後、25容積%のグルタルアルデヒド溶液0.5 μ l滴下し、架橋反応によってクレアゼ固定化膜を成膜し尿酸センサーを作製した。

特開昭62-185160 (5)

このようにして被着したウレアーゼ又はグルコースオキシダーゼの酵素膜と酸化イリジウム膜との密着性は良好で、3週間程度の測定を繰り返した耐久性試験の結果では、劣化やセンサー特性の低下はみられなかった。

実施例 2 <グルコースセンサー>

ウレアーゼの代りにグルコースオキシダーゼ(ナガセ生化学工業(株)製)を用いた以外は、上記ウレアーゼ固定化膜の場合と同様にしてグルコースセンサーを作製した。被着したグルコースオキシダーゼの酵素膜と酸化イリジウム膜との密着性は実施例1と同様に良好であった。

以上のようにして作製したバイオセンサーを用いて以下の試験を行った。

試験例 1

実施例1で作製した尿素センサーの出力応答特性を次の方法により調べた。すなわち0.01M トリス-塩酸塩緩衝液(pH7.0)中に尿素有20mg/dL又は50mg/dLとなるように添加したときの出力電圧の時間変化を調べた。なお、測定

は30℃で行ない、電位はAg/AgCl電極に対して測定した。結果を第3図に示す。

第3図に示す如く、出力電圧には緩やかではあるが大きな変化が見られた。また、応答速度は通常のISFETと同程度であった。

試験例 2

実施例1で作製した尿素センサーの尿素に対する検量線を作成した。試験は、尿素濃度を5~1000mg/dLの範囲で変えた以外は試験例1と同様にして行なった。尿素添加後5分後の出力電圧をもとに作成した検量線を第4図に示す。

第4図に示す如く、尿素濃度10~100mg/dLの範囲で出力電圧に約15mVの変化が見られた。このことから、本発明の尿素センサーが実用に供しうるものであることが分った。

試験例 3

実施例1で作製したグルコースセンサーの出力応答特性を試験例1と同様にして調べた。結果を第5図に示す。

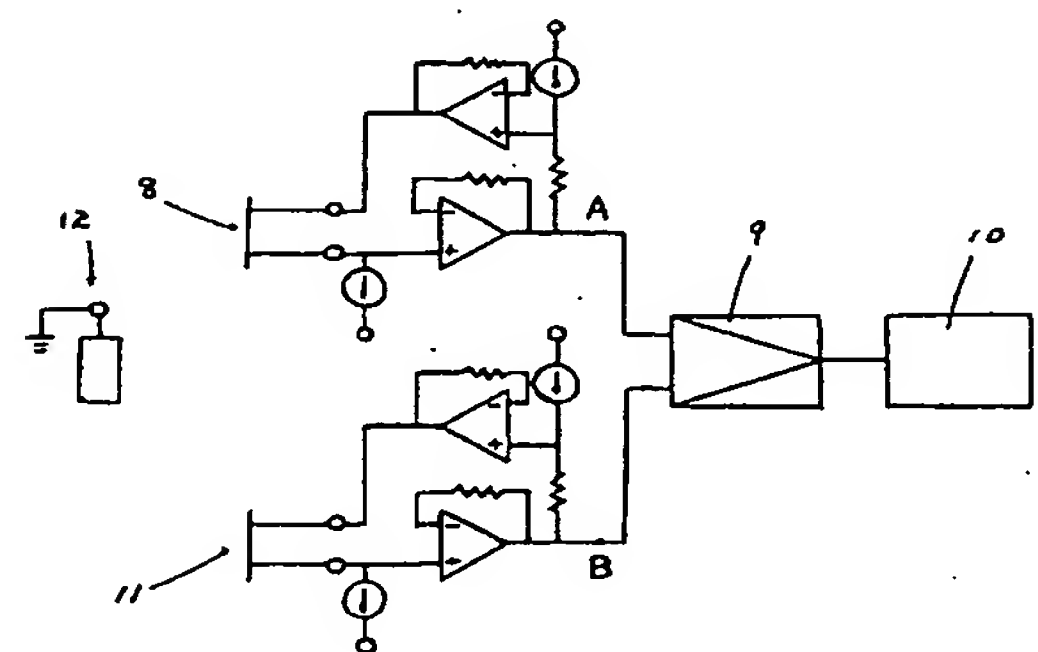
試験例 4

実施例1で作製したグルコースセンサーのグルコースに対する検量線を作成した。結果を第6図に示す。

第6図に示す如く、グルコース濃度10~100mg/dLの範囲で出力電圧に約11mVの変化が見られた。従って、本発明のグルコースセンサーも尿素センサー同様実用に供しうるものであることが分った。

4. 図面の簡単な説明

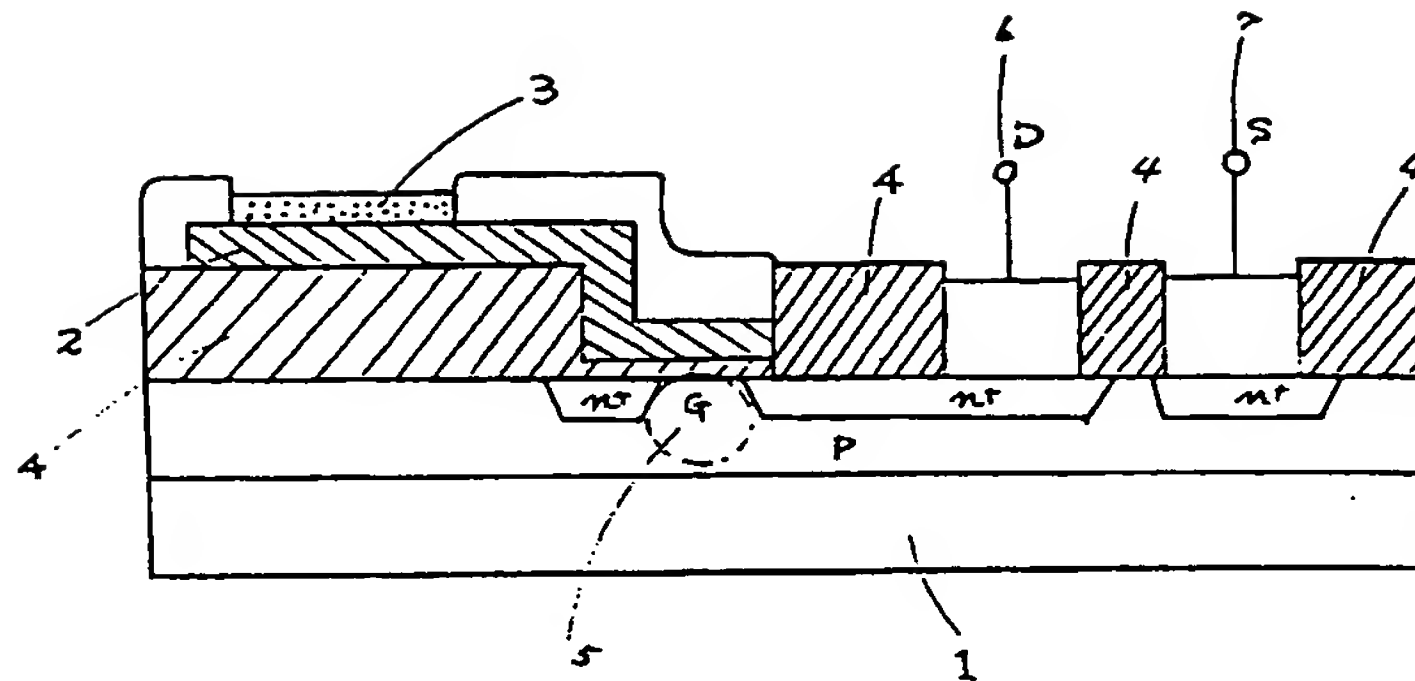
第1図は本発明のバイオセンサーの構造の一例を示す図面である。第2図は本発明のバイオセンサーの測定装置の回路図を示す図である。第3図は実施例1のウレアーゼセンサーの出力電圧の時間変化を示す図面である。第4図は同センサーの尿素に対する検量線である。第5図は実施例2のグルコースセンサーの出力電圧の時間変化を示す図面である。第6図は同センサーのグルコースに対する検量線である。



第2図

- 8 バイオセンサー
- 9 差動増幅器
- 10 レコーダー
- 11 対照用電極
- 12 Ag/AgCl電極

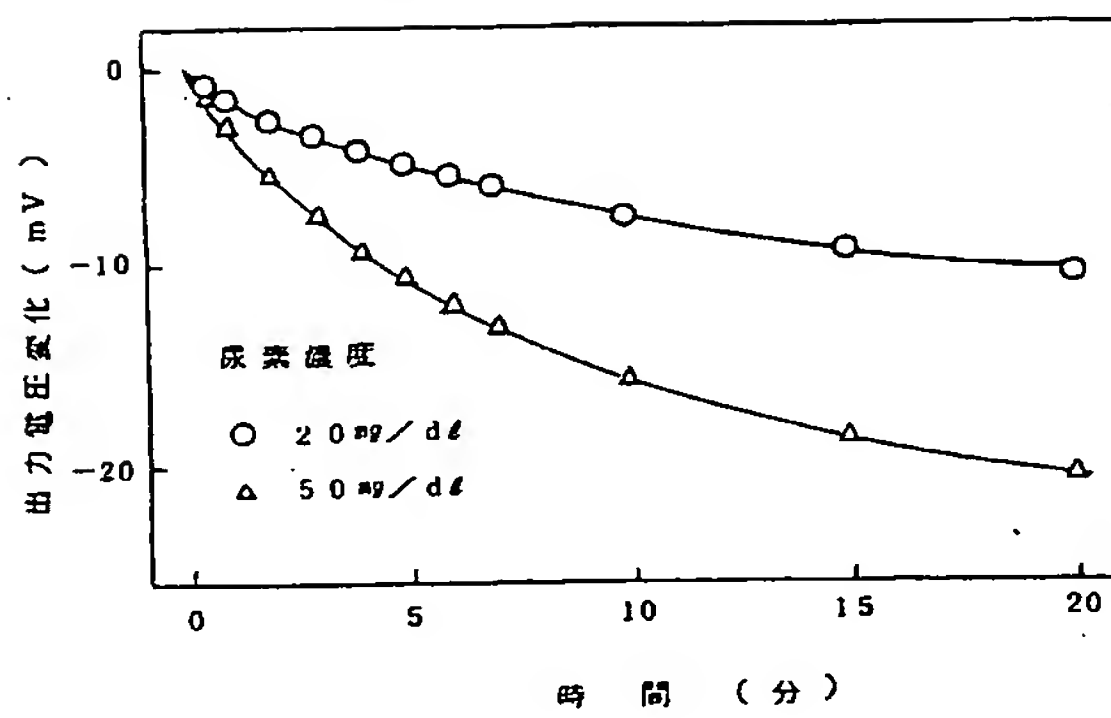
特開昭62-185160 (6)



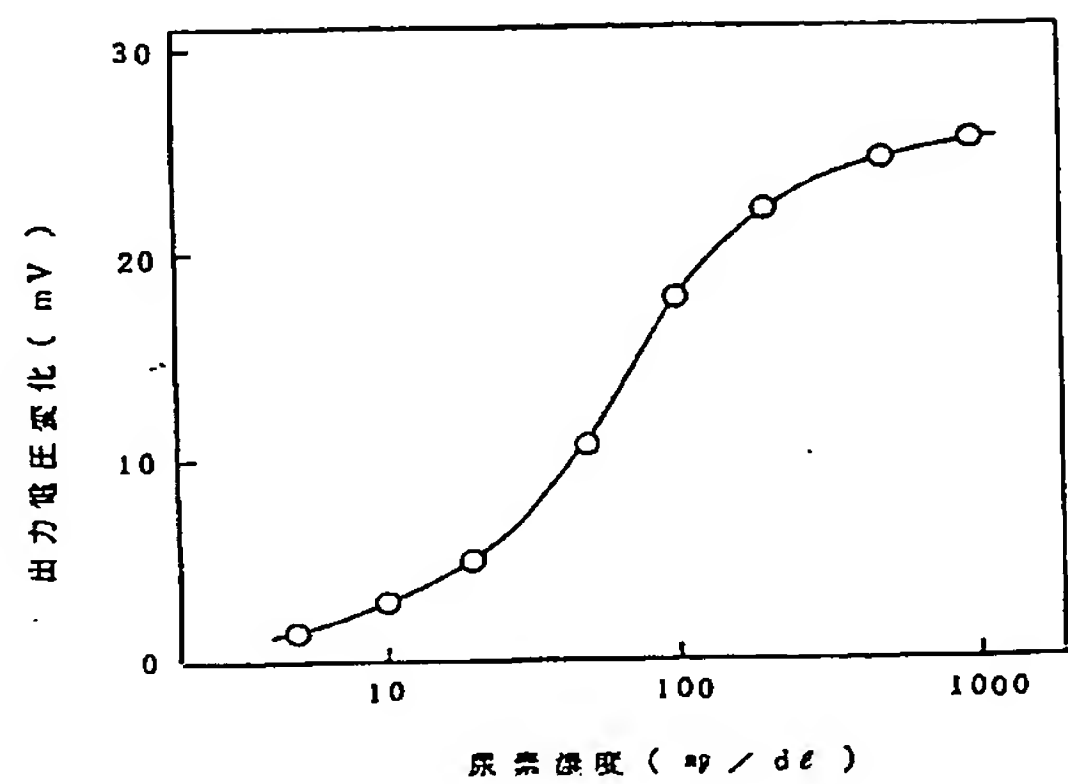
第1図

- | | | | |
|---|---------|---|------|
| 1 | サファイア基板 | 5 | ゲート |
| 2 | イオン感応膜 | 6 | ドレイン |
| 3 | 酵素膜 | 7 | ソース |
| 4 | 絶縁材 | | |

第3図

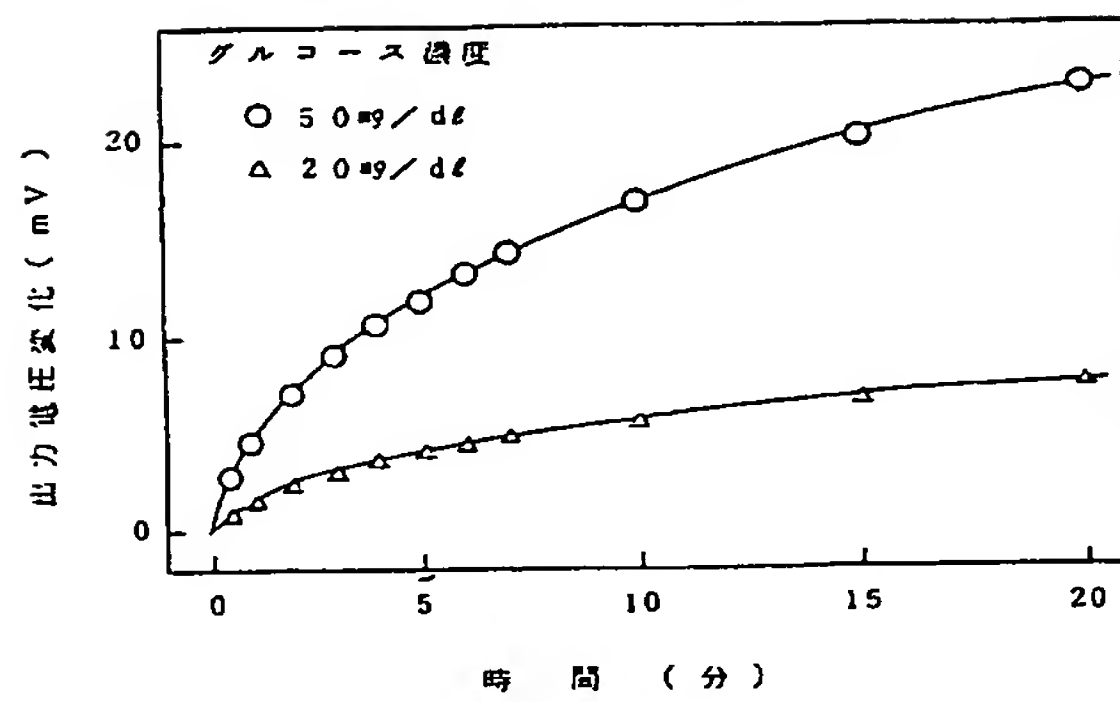


第4図



特開昭62-185160 (7)

第 5 図



第 6 図

